



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología**

**Detección molecular de tripanosomátidos y  
*Trypanosoma cruzi* en sangre de primates no humanos  
mediante PCR anidada**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo  
Parasitólogo

**AUTOR**

Esar Ezequiel AYSANOA MOORE

**ASESOR**

Giovanna Elizabeth SOTIL CAYCHO

Lima, Perú

2015

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* y es potencialmente letal. Usualmente se transmite por vectores, pero la transmisión también puede ocurrir accidentalmente por vía oral o por exposición de mucosas durante la manipulación de animales infectados. Ya que los primates no humanos pueden infectarse con este parásito, existe un riesgo para las personas que están en contacto con ellos.

Para realizar la identificación por PCR de *T. cruzi* en primates no humanos, se optimizó un protocolo anidado usando dos pares de cebadores dirigidos al gen 24S alfa de la subunidad mayor de ribosoma. Se analizaron muestras de sangre de mono colectadas en tubos con EDTA y tarjetas FTA provenientes de siete ciudades peruanas: Yurimaguas (n=69), Pucallpa (n=29), Puerto Maldonado (n=26), Iquitos (n=1), Moyobamba (n=17), Lima (n=34), y Cuzco (n=18). Las muestras fueron colectadas entre noviembre 2011 y mayo 2012 por la ONG *Wildlife Conservation Society* (WCS) mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia. De cada muestra también se realizaron frotis y gota gruesas para detección de hemoparásitos por microscopía. Los productos de amplificación de la primera reacción fueron de aproximadamente 240-280 pb y amplificaron secuencias conservadas en todos los tripanosomátidos, mientras que los de la segunda PCR fueron de 110-130 pb y amplificaron una secuencia interna, exclusiva de *T. cruzi*. No se observó una reacción cruzada con ADN de mamífero (*Aotus*, humanos) ni con otros parásitos como *Plasmodium spp.* El límite de detección del protocolo fue de 1,5 pg de ADN para tripanosomátidos y de 15 fg para *T. cruzi*; lo que equivale aproximadamente a 4,5 y 0,045 parásitos, respectivamente. Sin embargo, como la cantidad de ADN de *T. cruzi* varía entre cepas y clones, este rango podría ser más amplio y detectar solo 12,5 parásitos en la primera reacción y 0,12 en la segunda. Al comparar la PCR con el diagnóstico por microscopía, se determinó que esta última fue menos específica (97,96%) y sensible (82,86%). Finalmente, al emplear el protocolo de PCR en

las muestras de primates no humanos, se encontró que la prevalencia de tripanosomátidos fue de 26,49% y la de *T. cruzi* 3,24%.

### **Palabras clave**

*T. cruzi*, Enfermedad de Chagas, PCR anidada (*nested*), Prevalencia, 24S alfa ADNr, Diagnóstico

## ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and it is potentially lethal. It is usually transmitted through vectors, but transmission can also occur accidentally via an oral route or mucous membrane exposure while handling infected animals. Non-human primates can become infected with this parasite and people in contact with them may be at risk. To identify *T. cruzi* in non-human primates, a nested PCR protocol was optimized using primers targeting the 24S alpha gene from the large ribosomal subunit. PCR was performed on blood samples collected in EDTA tubes and FTA cards from primates from seven Peruvian cities: Yurimaguas (n=69), Pucallpa (n=29), Puerto Maldonado (n=26), Iquitos (n=1), Moyobamba (n=17), Lima (n=34), and Cuzco (n=18). Samples were collected using non-probability convenience sampling between November 2011 and May 2012 by NGO Wildlife Conservation Society (WCS). Thin and thick blood smears were prepared from each primate, for hemoparasite detection by microscopy. PCR amplification products from the first PCR reaction amplified conserved sequences in trypanosomatids of approximately 240-280 bp in size, while the second PCR reaction amplified an internal sequence, exclusive of *T. cruzi*, of 110-130 bp in size. Cross-reactions were not observed with mammalian DNA (*Aotus* and human) nor with other parasites such as *Plasmodium* spp. The detection limit was 1.5 pg of parasite DNA for trypanosomatids and 15 fg for *T. cruzi*; which roughly corresponds to 4.5 and 0.045 parasites, respectively. However, as the amount of *T. cruzi* DNA varies between strains and clones, this range could be wider and detect only 12.5 parasites in the first reaction and 0.12 in the second one. When comparing PCR with microscopy, the latter was less specific (97.96%) and sensitive (82.86%). When using the PCR protocol in non-human primate samples, a trypanosomatid prevalence of 26.49% and a *T. cruzi* prevalence of 3.24% was found.

### **Keywords**

*T. cruzi*, Chagas disease, Nested PCR, Prevalence, 24S alpha rDNA, Diagnosis